

Michael Heuser  
Dr. med.

## **Reproduzierbare Quantifizierung der Zytostatikaempfindlichkeit menschlicher Tumorzelllinien durch Beseitigung photochemischer Artefakte**

Geboren am 13.11.1974 in Stuttgart

Reifeprüfung am 17.06.1994

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995/1996 bis WS 2001/2002

Physikum am 09.09.1997 an der Freien Universität Berlin

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg, Detroit/Michigan, USA und Kansas City/Kansas, USA

Staatsexamen am 18.06.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. med. C. Granzow

Das Potenzial der onkologischen Chemotherapie kann vor allem deswegen nicht voll ausgeschöpft werden, weil es trotz jahrzehntelanger Bemühungen bis heute nicht gelungen ist, einen klinisch brauchbaren Labortest zur Vorhersage der Chemotherapierbarkeit solider menschlicher Tumoren zu entwickeln. Ein Hauptproblem ist hierbei die inadäquate Reproduzierbarkeit solcher sog. Chemosensibilitätstests. Wegen der Systemtoxizität der Zytostatika dürfen die Testergebnisse nur um einen Faktor  $< 2$  voneinander abweichen. Mit konventionellen Methoden gewonnene Resultate von Untersuchungen an Standardzellstämmen aus den letzten zehn Jahren zeigen demgegenüber Abweichungen um drei bis vier Zehnerpotenzen! In vorangegangenen Untersuchungen wurden photochemische Artefakte in Zellkulturmedien als bedeutsamer Störfaktor identifiziert. Sie beruhen auf Photosensibilisierung der Medien durch Riboflavin und führen u. a. zur unkontrollierten Degradierung der Zytostatika nach Belichtung der Medien. Durch geeignete Vorsichtsmaßnahmen können solche Artefakte völlig vermieden werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde geprüft, ob dadurch die Reproduzierbarkeit von Chemosensibilitätstests mit klinisch relevanten Zytostatika an vielverwendeten chemosensiblen und chemoresistenten menschlichen Tumorzelllinien verbessert werden kann.

Die genannten Artefakte wurden durch Verwendung flavinfreier Zellkulturmedien mit Serumzusatz und durch Beleuchtungsbedingungen verhindert, unter denen Flavine photochemisch nicht aktiviert werden können. Getestet wurden die Tubulininhibitoren Vinblastin, Vincristin, Vinorelbin und Taxol, die Topoisomerase-II-Inhibitoren Doxorubicin und Etoposid, der Komplexbildner Cisplatin sowie Gemcitabin als Vertreter der Antimetabolite. Als Zellstämme wurden neben universell chemosensiblen KB-Zellen und einer multidrogenresistenten, P-Glykoprotein exprimierenden Unterlinie (KBC5-8) mehrere Bronchialkarzinomzelllinien eingesetzt. Dabei handelte es sich um chemosensible (NCI-H69) und multidrogenresistente (H69AR, exprimiert MRP1), kleinzellige Tumorzelllinien sowie um die multidrogenresistente Nichtkleinzeller-Linie A240286S. Als Maß für die Wirksamkeit von Zytostatika wurde die Zytostatikumkonzentration bestimmt, die die Zellvermehrung zu 50% hemmt ( $IC_{50}$ ). Die  $IC_{50}$ -Werte wurden durch lineare Regressionsanalyse mit Hilfe des Statistikprogramms ADAM (Abt. Biostatistik des DKFZ) in einem Proliferationsassay bestimmt, der auf Zählung von Einzelzellen mit dem Analysegerät Casy 1 beruht. Die Signifikanzprüfung erfolgte durch Vergleich der 95%-Konfidenzintervalle.

Unter den gewählten Bedingungen konnte für alle Zytotoxizitätstests mit den genannten Zelllinien und Zytostatika eine Inter-Testvariabilität um einen Faktor  $< 2$  erzielt

werden. Die Tabelle enthält die zugehörigen Mittelwerte (aus Raumgründen ohne Konfidenzintervalle).

Zytostatikum	Zelllinie				
	KB	KBC5-8	NCI-H69	H69AR	A240286S
	IC <sub>50</sub> (nM)				
<b>VLB</b>	<b>1,09</b>	<b>24,18</b>	<b>1,09</b>	<b>4,41</b>	<b>3,52</b>
<b>VCR</b>	<b>0,95</b>	<b>68,59</b>	<b>1,63</b>	<b>36,21</b>	<b>15,44</b>
<b>VRL</b>	<b>1,4</b>	<b>93,24</b>	<b>1,58</b>	<b>10,74</b>	<b>13,96</b>
<b>TAX</b>	<b>2,3</b>	<b>168</b>	<b>2,84</b>	<b>5,18</b>	<b>36,45</b>
<b>DOX</b>	<b>4,93</b>	<b>37,14</b>	<b>25,24</b>	<b>552,8</b>	<b>19,98</b>
<b>ETO</b>	<b>105,8</b>	<b>1435</b>	<b>721,3</b>	<b>21308</b>	<b>561,7</b>
<b>CIS</b>	<b>151</b>	<b>172,8</b>	<b>225</b>	<b>125,8</b>	<b>797,5</b>
<b>GEM</b>	<b>9,11</b>	<b>11,81</b>	<b>6,8</b>	<b>5,1</b>	<b>3,93</b>

IC<sub>50</sub>-Werte für die angegebenen Zytostatika und Zelllinien aus je 5-13 unabhängigen Experimenten.

Diese IC<sub>50</sub>-Werte sind im Vergleich mit unter konventionellen Testbedingungen gewonnenen Resultaten anderer Autoren außerordentlich niedrig. Der Anstieg der molaren Wirksamkeit der Zytostatika dürfte vor allem auf dem Wegfall der flavinvermittelten Photodegradierung beruhen. Die Intra-Testvariabilität von Tests mit NCI-H69-Zellen konnte zusätzlich verringert werden durch Vermeidung des "Randeffektes" in Mikrotiterplatten und durch spezielle Maßnahmen zur Vereinzelnung dieser in dicht gepackten Aggregaten wachsenden Zellen.

Unter Bedingungen, die flavinvermittelte photochemische Artefakte ausschließen, können demnach IC<sub>50</sub>-Bestimmungen bei menschlichen Tumorzellen durchgeführt werden, die bezüglich der Testreproduzierbarkeit klinischen Erfordernissen voll entsprechen. Es ist anzunehmen, dass solche Artefakte eine Hauptursache für das Fehlschlagen aller bisherigen Bemühungen um einen klinisch brauchbaren Labortest auf Chemotherapierbarkeit menschlicher Tumoren darstellen. Dieses Hindernis wurde jetzt aus dem Weg geräumt. Künftige Tests unter Verwendung von Zellkulturmedien, insbesondere beim Medikamentenscreening, sollten nur unter Bedingungen erfolgen, die flavinvermittelte Photoreaktionen sicher ausschließen. Im Organismus spielen derartige Photoreaktionen keine Rolle. Deshalb dürfte die hier aufgezeigte, außerordentlich hohe molare Wirksamkeit der Zytostatika den in vivo-Verhältnissen weitgehend entsprechen. Diese Erwartung wurde in unabhängigen Studien mit bronchoskopisch gewonnenem Tumormaterial bereits bestätigt, bei denen KB-Zellen zur Testkalibrierung herangezogen wurden.